

09/445362

REC'D	12 AUG 1998
WIPO	PC



## Bescheinigung

Die MediGene Aktiengesellschaft in Planegg/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Herz- und Skelettmuskel-spezifische Nukleinsäure,  
ihre Herstellung und Verwendung"

am 13. Juni 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole C 07 K, A 61 K und C 12 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 16. Juni 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag



Zeichen: 197 25 186.2

Grüner

## PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

5                   **Herz- und Skelettmuskel-spezifische Nukleinsäure,**  
                      **ihre Herstellung und Verwendung**

Die Erfindung betrifft eine im menschlichen Herz- und Skelettmuskel ex-  
primierte Nukleinsäure, ihre Herstellung und Verwendung als Diagnostikum,  
10   Arzneimittel und Test zur Identifizierung funktioneller Interaktoren.

Das Herz ist ein muskuläres Hohlorgan mit der Aufgabe, durch wechselnde  
Kontraktion (Systole) und Erschlaffung (Diastole) von Vorhöfen und Kam-  
mern den Blutstrom in den Gefäßen in Bewegung zu halten.

15   Der Herzmuskel, das Myokard, setzt sich aus spezialisierten quergestreiften  
Muskelzellen zusammen, zwischen denen Bindegewebe liegt. Jede Zelle  
besitzt einen zentralen Kern, wird von der Plasmamembran, dem Sarko-  
lemm, begrenzt und enthält zahlreiche kontraktile Myofibrillen, die unregel-  
20   mäßig durch Sarkoplasma getrennt sind. Die kontraktile Substanz des Her-  
zens bilden lange parallele Myofibrillen. Jede Myofibrille unterteilt sich in  
mehrere gleiche strukturelle und funktionelle Einheiten, die Sarkomere. Die  
Sarkomere wiederum setzen sich aus den dünnen Filamenten, die hauptsäch-  
lich aus Aktin, Tropomyosin und Troponin bestehen und den dicken Fila-  
25   menten zusammen, die hauptsächlich aus Myosin bestehen.

Der molekulare Mechanismus der Muskelkontraktion beruht auf einer zykli-  
schen Anheftung und Ablösung der globulären Myosinköpfe von den F-  
Aktinfilamenten. Bei elektrischer Stimulation des Herzmuskels wird  $\text{Ca}^{2+}$  aus  
30   dem sarkoplasmatischen Retikulum freigesetzt, welches durch eine allosteri-  
sche Reaktion den Troponin-Komplex und Tropomyosin beeinflusst und so

den Weg frei macht für einen Kontakt des Aktinfilamentes mit dem Myosinkopf. Die Anheftung bewirkt eine Konformationsänderung des Myosins, welches so das Aktinfilament an sich entlang zieht. Um diese Konformationsänderung rückgängig zu machen und an den Anfang eines Kontraktionszyklus zurückzukehren, wird ATP benötigt.

Die Aktivität des Herzmuskels kann durch nervöse und hormonelle Regulationsmaßnahmen kurzfristig an den jeweiligen Perfusionsbedarf, d. h. Durchblutungsbedarf, des Körpers angepaßt werden. So können sowohl die Kontraktionskraft als auch die Kontraktionsgeschwindigkeit gesteigert werden. Bei langfristiger Überbeanspruchung kommt es zu physiologischen Umbauvorgängen im Herzmuskel, die hauptsächlich durch eine Vermehrung der Myofibrillen charakterisiert sind (Myozytenhypertrophie).

Bei Schädigungen des Herzmuskels führen oft die ursprünglich physiologischen Anpassungsmechanismen langfristig zu pathophysiologischen Zuständen, die in chronische Herzinsuffizienz, d. h. Herzschwäche, münden und meistens mit akutem Herzversagen enden. Bei schwerer chronischer Insuffizienz kann das Herz nicht mehr adäquat auf veränderte Leistungsanforderungen reagieren, selbst geringe körperliche Verrichtungen führen zu Erschöpfung und Atemnot.

Schädigungen des Herzmuskels resultieren aus Ischämie, d. h. Blutleere, verursacht durch Koronarerkrankungen, bakteriellen oder viralen Infektionen, Toxinen, metabolischen Abnormalitäten, Autoimmunerkrankungen oder genetischen Defekten. Therapeutische Maßnahmen richten sich zur Zeit auf eine Stärkung der Kontraktionskraft und eine Kontrolle der kompensatorischen neuronalen und hormonellen Kompensationsmechanismen. Trotz dieser Behandlung ist die Sterblichkeit dieser Erkrankung nach wie vor hoch (35-50% innerhalb der ersten 5 Jahre nach Diagnose). Herzinsuffizienz ist die Haupt-

todesursache weltweit. Die einzige Kausaltherapie stellt die Herztransplantation dar.

Die molekularen Veränderungen bei chronischer Herzinsuffizienz sind nur ungenügend bekannt. Insbesondere die genetischen Veränderungen, die der Herzinsuffizienz zugrundeliegen, sind weitgehend unbekannt. Auch die Frage, warum sekundäre Schädigungen durch Toxine oder Viren bei manchen Menschen zur Herzinsuffizienz führen, jedoch bei anderen nicht, bleibt unbeantwortet.

10

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, Gene zu identifizieren und zu isolieren, die für genetisch bedingte Herzerkrankungen zumindest mitverantwortlich, wenn nicht sogar ursächlich sind.

15 Es wurde nun überraschenderweise in einer cDNA-Bank des menschlichen Herzgewebes ein Gen gefunden, das im insuffizienten Herzgewebe stärker exprimiert wird als im gesunden Herzgewebe und somit in einem kausalen Zusammenhang mit einer genetisch bedingten Herzinsuffizienz steht.

20 Ein Gegenstand der Erfindung ist daher eine Nukleinsäure kodierend für ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz gemäß Fig. 4 oder eine funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 8 Nukleotiden, vorzugsweise mindestens 10 Nukleotiden, insbesondere mindestens 15 Nukleotiden, vor allem mindestens 20 Nukleotiden (nachfolgend "erfindungsgemäße Nukleinsäure genannt").

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure wurde aus einer cDNA-Bank des menschlichen Herzgewebes isoliert und sequenziert. Hierzu wurde zuerst aus einer gesunden und insuffizienten Herzgewebe-Probe Gesamt-RNA nach Standardmethoden isoliert und mit Hilfe eines 3'-Anker-Primergemisches, z.

30

B. eines 5'-T<sub>12</sub>ACN-3' Primers, bei dem N ein beliebiges Deoxyribonukleotid bedeutet, und reverser Transkriptase in c-DNA umgeschrieben. Die cDNA wurde anschließend in Anlehnung an die sogenannte Differential Display Methode nach Liang und Pardee (Liang, P. & Pardee, A. (1992) *Science* 257, 967-970) unter speziellen PCR-Bedingungen mit Hilfe eines 3'-Primers, z. B. eines T<sub>12</sub>ACN-Primers, und eines willkürlich ausgewählten 5'-Dekamer-Primer, z. B. eines 5'-CCTTCTACCC-3'-Dekamer-Primers, amplifiziert. Hierbei konnte ein 321 Basenpaar (bp)-langes DNA-Fragment amplifiziert werden, das überraschenderweise nicht in der gesunden Herzprobe, jedoch deutlich in der insuffizienten Herzprobe vorhanden ist. Dies war deshalb so überraschend, da die gängigen Methoden wie Differential Display Methode oder auch subtraktive cDNA-Genbanken mit dem Problem der Redundanz, der Unterrepräsentation und der falsch positiven Klone behaftet sind. Insbesondere die Genprodukte schwach exprimierter Gene können nur unter speziellen Bedingungen identifiziert werden. Daher ist es auch nicht verwunderlich, daß die Trefferquote im allgemeinen sehr gering (10-20%) ist und beispielsweise bei der Differentiellen Display Methode auch von den gewählten PCR-Bedingungen, der Primer-Länge oder beispielsweise bei der Herstellung subtraktiver Banken von der Hybridisierungstemperatur abhängt. Anschließend wurde das gesamte Gen aus einer cDNA-Genbank mit Hilfe des gefundenen DNA-Fragmentes isoliert und sequenziert.

In jedem Fall ist es notwendig, durch weitere Methoden aufzuklären, ob die gefundene cDNA einem aktiven und/oder gewebespezifischen Gen zugeordnet werden kann. Daher wurden mRNAs aus verschiedenen menschlichen Geweben mit dem gefundenen DNA-Fragment in einem sogenannten Northern-Blot hybridisiert und die Menge an gebundener m-RNA beispielsweise über die radioaktive Markierung des DNA-Fragments bestimmt. Dieses Experiment führte zu einem Nachweis der korrespondierenden RNA vor allem in quergestreifter Muskulatur, also Herzmuskel- und Skelettmuskelgewebe sowie sehr

schwach in Prostatagewebe. In einem weiteren Vergleichsexperiment zwischen gesundem und insuffizientem Herzgewebe wurde eine erhöhte Expression, beispielsweise eine um ca. 35% erhöhte Expression der RNAs in insuffizientem Gewebe im Vergleich zum gesunden Gewebe nachgewiesen. Insbesondere konnte nachgewiesen werden, daß eine kleinere RNA-Spezies bevorzugt in insuffizientem Gewebe im Vergleich zum gesunden Gewebe eine erhöhte Expression aufweist. Die erhöhte Expression der kleineren RNA-Spezies ist beispielsweise im Northern-Blot in Form einer Doppelbande leicht zu erkennen (siehe Fig. 5b).

Ein Vergleich der abgeleiteten Polypeptidsequenz mit einer Proteindatenbank ergab zudem eine gewisse Verwandtschaft (Homologie) mit dem Protein Tropomodulin (siehe Fig. 4). Tropomodulin ist als ein Polypeptid bekannt, das in Hühnchen-Kardiomyozyten Einfluß auf die Ausbildung der Myofibrillen und die Kontraktionsfähigkeit der Zellen hat (Gregorio et al. (1995) *Nature* 377, 83-86). Dieses Protein bindet zum einen an Tropomyosin und zum anderen an die Actin-Filamente, wird aber selbst nicht in seiner Aktivität reguliert. Das abgeleitete erfindungsgemäße Polypeptid weist ebenso einige Strukturmerkmale des Tropomodulins auf, wie z. B. eine Tropomyosin-Bindedomäne. Im Gegensatz zu Tropomodulin besitzt das erfindungsgemäße Polypeptid zusätzliche Strukturmerkmale, die auf eine Regulation der Aktivität des Polypeptids durch sogenannte Tyrosinkinasen hinweisen (siehe Fig. 4).

Unter dem Begriff "funktionelle Variante" im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man daher Polypeptide, die funktionell mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid verwandt sind, d. h. ebenso als ein regulierbarer Modulator der Kontraktionsfähigkeit von Herzmuskelzellen bezeichnet werden können, in quergestreifter Muskulatur, vorzugsweise in Herzmuskel-, Skelettmuskel- und/oder Prostatagewebe, vor allem in Herzmuskel- und/oder Ske-

lettmuskel und insbesondere in Herzmuskelzellen exprimiert werden, Strukturmerkmale des Tropomodulins aufweisen, wie z. B. eine oder mehrere Tropomyosin-Bindedomänen, und/oder deren Aktivität durch Tyrosinkinasen reguliert werden können. Beispiele funktioneller Varianten sind die entsprechenden Polypeptide, die aus anderen Organismen als dem Menschen, vorzugsweise aus nicht-menschlichen Säugetieren, wie z. B. Affen, stammen.

Im weiteren Sinne versteht man darunter auch Polypeptide, die eine Sequenzhomologie, insbesondere eine Sequenzidentität, von ca. 70%, vorzugsweise ca. 80%, insbesondere ca. 90%, vor allem ca. 95% zu dem Polypeptid mit der Aminosäuresequenz gemäß Fig. 4 haben. Darunter zählen beispielsweise Polypeptide, die von einer Nukleinsäure kodiert werden, die aus nicht-herzspezifischem Gewebe, z. B. Skelettmuskelgewebe, isoliert wird, jedoch nach Expression in einer herzspezifischen Zelle die bezeichnete Funktion(en) besitzt. Ferner zählen hierzu auch Deletionen des Polypeptids im Bereich von ca. 1-60, vorzugsweise von ca. 1-30, insbesondere von ca. 1-15, vor allem von ca. 1-5 Aminosäuren. Beispielsweise kann die erste Aminosäure Methionin fehlen, ohne daß die Funktion des Polypeptids wesentlich verändert wird. Daneben zählen hierzu auch Fusionsproteine, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Polypeptide enthalten, wobei die Fusionsproteine selbst bereits die Funktion eines regulierbaren Modulators der Kontraktionsfähigkeit von Herzmuskelzellen haben oder erst nach Abspaltung des Fusionsanteils die spezifische Funktion bekommen können. Vor allem zählen hierzu Fusionsproteine mit einem Anteil von insbesondere nicht-herzspezifischen Sequenzen von ca. 1-200, vorzugsweise ca. 1-150, insbesondere ca. 1-100, vor allem ca. 1-50 Aminosäuren. Beispiele von nicht-herzspezifischen Peptidsequenzen sind prokaryotische Peptidsequenzen, die z. B. aus der Galactosidase von E. coli abgeleitet sein können.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure ist im allgemeinen eine DNA oder RNA, vorzugsweise eine DNA. Für die Expression des betreffenden Gens ist im allgemeinen eine doppelsträngige DNA bevorzugt und für die Verwendung als Sonde eine einzelsträngige DNA. Besonders bevorzugt ist eine  
5 doppel- oder einzelsträngige DNA mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß Fig. 1, 2 oder 3 und die oben bereits näher beschriebenen Teile davon, wobei der für das Polypeptid kodierende DNA-Bereich besonders bevorzugt ist. Dieser Bereich beginnt mit den Nukleinsäuren "ATG" kodierend für Methionin an der Position 89 bis "TAG" kodierend für "Amber" (Stop) an der  
10 Position 1747.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure kann beispielsweise chemisch anhand der in Fig. 1-3 offenbarten Sequenzen oder anhand der in Fig. 4 offenbarten Polypeptidsequenz unter Heranziehen des genetischen Codes z. B. nach der  
15 Phosphotriester-Methode synthetisiert werden (siehe z. B. Uhlmann, E. & Peyman, A. (1990) *Chemical Reviews*, 90, 543-584, No. 4). Eine weitere Möglichkeit, die erfindungsgemäße Nukleinsäure in die Hand zu bekommen, ist die Isolierung aus einer geeigneten Genbank, beispielsweise aus einer herzspezifischen Genbank, anhand einer geeigneten Sonde (siehe z. B. J.  
20 Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Als Sonde eignen sich beispielsweise einzelsträngige DNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 100-1000 Nukleotiden, vorzugsweise mit einer Länge von ca. 200-500 Nukleotiden, insbesondere mit einer Länge von ca. 300-400 Nukleotiden  
25 deren Sequenz aus den Nukleinsäuresequenzen gemäß Fig. 1-3 abgeleitet werden kann. Ein Beispiel einer Sonde ist das 321 bp große DNA-Fragment gemäß Beispiel 1, das dem unterstrichenen Bereich in Fig. 1 entspricht, mit dem bereits erfolgreich die erfindungsgemäße Nukleinsäure aus humanem Herzgewebe isoliert wurde (siehe Beispiel 2).



Üblicherweise ist die erfindungsgemäße Nukleinsäure in einem Vektor, vorzugsweise in einem Expressionsvektor oder gentherapeutisch wirksamen Vektor enthalten. Vorzugsweise enthält der gentherapeutisch wirksame Vektor herzspezifische regulatorische Sequenzen, wie z. B. den Troponin C (cTNC) Promotor (siehe z. B. Parmacek, M. S. et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265 (26) 15970-15976 und Parmacek, M. S. et al. (1992) *Mol. Cell Biol.* 12(5), 1967-1976), der funktionell mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäure verbunden ist.

Die Expressionsvektoren können prokaryotische oder eukaryotische Expressionsvektoren sein. Beispiele für prokaryotische Expressionsvektoren sind für die Expression in *E. coli* z. B. die Vektoren pGEM oder pUC-Derivate und für eukaryotische Expressionsvektoren für die Expression in *Saccharomyces cerevisiae* z. B. die Vektoren p426Met25 oder p426GAL1 (Mumberg et al. (1994) *Nucl. Acids Res.*, 22, 5767-5768), für die Expression in Insektenzellen z. B. Baculovirus-Vektoren wie in EP-B1-0 127 839 oder EP-B1-0 549 721 offenbart, und für die Expression in Säugerzellen z. B. die Vektoren Rc/CMV und Rc/RSV oder SV40-Vektoren, welche alle allgemein erhältlich sind.

Im allgemeinen enthalten die Expressionsvektoren auch für die jeweilige Wirtszelle geeignete Promotoren, wie z. B. den trp-Promotor für die Expression in *E. coli* (siehe z. B. EP-B1-0 154 133), den ADH2-Promotor für die Expression in Hefen (Russel et al. (1983), *J. Biol. Chem.* 258, 2674-2682), den Baculovirus-Polyhedrin-Promotor für die Expression in Insektenzellen (siehe z. B. EP-B1-0 127 839) oder den frühen SV40 Promotor oder LTR-Promotoren z. B. von MMTV (mouse mammary tumour virus; Lee et al. (1981) *Nature* 214, 228-232).

Beispiele von gentherapeutisch wirksamen Vektoren sind Virusvektoren, vorzugsweise Adenovirusvektoren, insbesondere replikationsdefiziente Adenovirusvektoren, oder Adenoassoziierte Virusvektoren, z. B. ein Adenoassoziiierter Virusvektor, der ausschließlich aus zwei invertierten terminalen Wiederholungssequenzen (ITR) besteht.

Ein Adenovirusvektor und insbesondere ein replikationsdefizienter Adenovirusvektor sind aus den folgenden Gründen besonders bevorzugt.

Das humane Adenovirus gehört zu der Klasse der doppelsträngigen DNA-Viren mit einem Genom von ca. 36 Kilobasenpaaren (Kb). Die virale DNA kodiert für etwa 2700 verschiedene Genprodukte, wobei man frühe ("*early genes*") und späte ("*late genes*") unterscheidet. Die "*early genes*" werden in vier transkriptionellen Einheiten, E1 bis E4, unterteilt. Die späten Genprodukte kodieren für die Kapsidproteine. Immunologisch können mindestens 42 verschiedene Adenoviren und die Untergruppen A bis F unterschieden werden, die alle für die vorliegende Erfindung geeignet sind. Die Transkription der viralen Gene setzt die Expression der E1-Region voraus, welche für einen Transaktivator der adenoviralen Genexpression kodiert. Diese Abhängigkeit der Expression aller nachfolgenden viralen Gene von dem E1-Transaktivator kann für die Konstruktion der nicht replikationsfähigen adenoviralen Vektoren genutzt werden (siehe z.B. McGrory, W.J. et al. (1988) *Viol.* 163, 614 - 617 und Gluzman, Y. et al. (1982) in "*Eukaryotic Viral Vectors*" (Gluzman, Y. ed.) 187 . 192, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York). In adenoviralen Vektoren, insbesondere vom Typ 5 (Sequenz siehe Chroboczek, J. et al. (1992) *Viol.* 186, 280 - 285) und vor allem von der Untergruppe C, wird im allgemeinen die E1-Genregion durch ein Fremdgen mit eigenem Promotor bzw. durch das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt ersetzt. Durch den Austausch der E1-Genregion, welche für die Expression der nachgeschalteten adenoviralen Gene

Voraussetzung ist, entsteht ein nicht replikationsfähiges Adenovirus. Diese Viren können sich dann nur in einer Zelllinie vermehren, welche die fehlenden E1-Gene ersetzt.

5 Replikationsdefiziente Adenoviren werden daher im allgemeinen durch homologe Rekombination in der sogenannten 293-Zelllinie (humane embryonale Nierenzelllinie), die eine Kopie der E1-Region stabil im Genom integriert hat, gebildet. Hierzu werden unter Kontrolle eines eigenen Promotors, z.B. des bereits oben genannten Troponin C Promotors, die erfindungsgemäße  
10 Nukleinsäure in rekombinante adenovirale Plasmide kloniert. Anschließend erfolgt die homologe Rekombination mit einem E1-defizienten adenoviralen Genom, wie z.B. dl327 oder del1324 (Adenovirus 5), in der Helferzelllinie 293. Bei erfolgreicher Rekombination werden virale Plaques geerntet. Die so erzeugten replikationsdefizienten Viren werden in hohen Titern (beispielsweise  
15  $10^9$  bis  $10^{11}$  "plaque forming units" oder plaquebildenden Einheiten) zur Infektion der Zellkultur oder für die somatische Gentherapie eingesetzt.

Im allgemeinen ist die genaue Insertionsstelle der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in das adenovirale Genom nicht kritisch. Es ist z.B. auch mög-  
20 lich, die erfindungsgemäße Nukleinsäure an die Stelle des deletierten E3-Gens zu klonieren (Karlsson, S. et al. *EMBO J.* 5, 1986, 2377 - 2385). Vorzugsweise wird jedoch die E1-Region oder Teile davon, z.B. die E1A- oder E1B-Region (siehe z.B. WO 95/00655) durch die erfindungsgemäße Nukleinsäure ersetzt, vor allem, wenn auch die E3-Region deletiert ist.

25

Die vorliegende Erfindung ist jedoch nicht auf das adenovirale Vektorsystem beschränkt, sondern auch Adeno-assoziierte Virusvektoren eignen sich in Kombination mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäure aus folgenden Gründen in besonderer Weise.

30

Das AAV-Virus gehört zur Familie der Parvoviren. Diese zeichnen sich durch ein ikosaedrisches, unbehülltes Kapsid mit einem Durchmesser von 18 bis 30 nm aus, welches eine lineare, einzelsträngige DNA von ca. 5 kb enthält. Für eine effiziente Vermehrung von AAV ist eine Koinfektion der Wirtszelle mit Helferviren erforderlich. Als Helfer eignen sich beispielsweise Adenoviren (Ad5 oder Ad2), Herpesviren und Vacciniaviren (Muzyczka, N. (1992) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158, 97 - 129). In Abwesenheit eines Helfervirus geht AAV in einen Latenzzustand über, wobei das Virusgenom in der Lage ist, stabil in das Wirtszellgenom zu integrieren. Die Eigenschaft von AAV, in das Wirtsgenom zu integrieren, macht es als Transduktionsvektor für Säugetierzellen besonders interessant. Für die Vektorfunktionen genügen im allgemeinen die beiden ca. 145 bp langen invertierten terminalen Wiederholungssequenzen (ITR: *inverted terminal repeats*; siehe z.B. WO 95/23867). Sie tragen die in "cis" notwendigen Signale für Replikation, Verpackung und Integration in das Wirtszellgenom. Zur Verpackung in rekombinante Vektorpartikel wird ein Vektorplasmid, welches die Gene für nicht-strukturelle Proteine (rep-Proteine) und für strukturelle Proteine (cap-Proteine) trägt, in Adenovirus-infizierte Zellen transfiziert. Nach einigen Tagen wird ein zellfreies Lysat hergestellt, welches neben den rekombinanten AAV-Partikeln auch Adenoviren enthält. Die Adenoviren können vorteilhafterweise durch Erhitzen auf 56°C oder durch Bandieren im Cäsiumchlorid-Gradienten entfernt werden. Mit dieser Cotransfektionsmethode sind rAAV-Titer von  $10^5$  bis  $10^6$  IE/ml erzielbar. Die Kontamination durch Wildtypviren liegt unterhalb der Nachweisgrenze, wenn das Verpackungsplasmid und das Vektorplasmid keine überlappenden Sequenzen besitzen (Samulski, R.J. (1989) *J. Virol.* 63, 3822 - 3828).

Der Transfer der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in somatische Körperzellen kann durch AAV in ruhende, differenzierte Zellen erfolgen, was für die Gentherapie des Herzens besonders vorteilhaft ist. Durch die erwähnte

- Integrationsfähigkeit kann auch eine lang anhaltende Genexpression *in vivo* gewährleistet werden, was wiederum besonders vorteilhaft ist. Ein weiterer Vorteil von AAV ist, daß das Virus nicht pathogen für den Menschen und relativ stabil *in vivo* ist. Die Klonierung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in den AAV-Vektor oder Teilen davon erfolgt nach dem Fachmann bekannten Methoden, wie sie z.B. in der WO 95/23867, bei Chiorini, J.A. et al. (1995), *Human Gene Therapy* 6, 1531 - 1541 oder Kotin, R.M. (1994), *Human Gene Therapy* 5, 793 - 801 beschrieben sind.
- 10 Getherapeutisch wirksame Vektoren lassen sich auch dadurch erhalten, daß man die erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Liposomen komplexiert, da damit eine sehr hohe Transfektionseffizienz, insbesondere von Herzmuskelzellen, erreicht werden kann (Felgner, P.L. et al. (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7413 - 7417). Bei der Lipofektion werden kleine
- 15 unilamellare Vesikel aus kationischen Lipiden durch Ultraschallbehandlung der Liposomensuspension hergestellt. Die DNA wird ionisch auf der Oberfläche der Liposomen gebunden, und zwar in einem solchen Verhältnis, daß eine positive Nettoladung verbleibt und die Plasmid-DNA zu 100% von den Liposomen komplexiert wird. Neben den von Felgner et al. (1987, supra)
- 20 eingesetzten Lipidmischungen DOTMA (1,2-Dioleoyloxypropyl-3-trimethylammoniumbromid) und DOPE (Dioleoylphosphatidylethanolamin) wurden inzwischen zahlreiche neue Lipidformulierungen synthetisiert und auf ihre Effizienz der Transfektion verschiedener Zelllinien getestet (Behr, J.P. et al. (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6982 - 6986; Felgner, J.H. et al.
- 25 (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 2550 - 2561; Gao, X. & Huang, L. (1991), *Biochim. Biophys. Acta* 1189, 195 - 203). Beispiele der neuen Lipidformulierungen sind DOTAP N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfat oder DOGS (TRANSFECTAM; Dioc-tadecylamidoglycylspermin). Ein Beispiel für die Herstellung von DNA-

Liposomenkomplexen und deren erfolgreiche Anwendung in der Herz-spezifischen Transfektion ist in der DE 44 11 402 beschrieben.

Für die gentherapeutische Anwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure ist es auch von Vorteil, wenn der Teil der Nukleinsäure, der für das Polypeptid kodiert, ein oder mehrere nicht-kodierende Sequenzen einschließlich Intronsequenzen, vorzugsweise zwischen Promotor und dem Startcodon des Polypeptids, und/oder eine polyA-Sequenz, insbesondere die natürlich vorkommende polyA-Sequenz oder eine SV40 Virus polyA-Sequenz, vor allem am 3'-Ende des Gens enthält, da hierdurch eine Stabilisierung der mRNA in der Herzmuskelzelle erreicht werden kann (Jackson, R. J. (1993) *Cell* 74, 9-14 und Palmiter, R. D. et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 478-482).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch das Polypeptid selbst mit einer Aminosäuresequenz gemäß Fig. 4 oder eine funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 6 Aminosäuren, vorzugsweise mit mindestens 12 Aminosäuren, insbesondere mit mindestens 15 Aminosäuren und vor allem mit mindestens 164 Aminosäuren (nachfolgend erfindungsgemäßes Polypeptid genannt).

Das Polypeptid wird beispielsweise durch Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in einem geeigneten Expressionssystem, wie oben bereits beschrieben, nach dem Fachmann allgemein bekannten Methoden hergestellt. Als Wirtszellen eignen sich beispielsweise die *E. coli* Stämme DH5, HB101 oder BL21, der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae*, die Insektenzelllinie Lepidopteran, z. B. von *Spodoptera frugiperda*, oder die tierischen Zellen COS, Vero, 293 und HeLa, die alle allgemein erhältlich sind.

Die genannten Teile des Polypeptids können auch mit Hilfe der klassischen Synthese (Merrifield-Technik) synthetisiert werden. Sie eignen sich insbesondere zur Gewinnung von Antiseren, mit deren Hilfe geeignete Genexpressionsbanken durchsucht werden können, um so zu weiteren funktionellen Varianten des erfindungsgemäßen Polypeptids zu gelangen.

Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung bezieht sich daher auch auf Antikörper, die mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid spezifisch reagieren, wobei die oben genannten Teile des Polypeptids entweder selbst immunogen sind oder durch Kopplung an geeignete Träger, wie z. B. bovines Serumalbumin, immunogen gemacht bzw. in ihrer Immunogenität gesteigert werden können.

Die Antikörper sind entweder polyklonal oder monoklonal. Die Herstellung, die auch einen Gegenstand der vorliegenden Erfindung darstellt, erfolgt beispielsweise nach allgemein bekannten Methoden durch Immunisieren eines Säugetiers, beispielsweise eines Kaninchens, mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid oder den genannten Teilen davon gegebenenfalls in Anwesenheit von z. B. Freund's Adjuvant und/oder Aluminumhydroxidgelen (siehe z. B. Diamond, B. A. et al. (1981) *The New England Journal of Medicine*, 1344-1349). Die im Tier aufgrund einer immunologischen Reaktion entstandenen polyklonalen Antikörper lassen sich anschließend nach allgemein bekannten Methoden leicht aus dem Blut isolieren und z. B. über Säulenchromatographie reinigen. So konnte beispielsweise gegen ein Polypeptid mit den erfindungsgemäßen Aminosäuren 1-90 gemäß Fig. 4, das als Fusionsprotein in Bakterien exprimiert und über eine Affinitätschromatographie gereinigt wurde, ein polyklonales Antiserum im Kaninchen erzeugt werden. Die erfindungsgemäßen Antikörper erkannten in Extrakten aus humanem Herzgewebe spezifisch das entsprechende Protein von ca. 80 kD.

Monoklonale Antikörper können beispielsweise nach der bekannten Methode von Winter & Milstein (Winter, G. & Milstein, C. (1991) *Nature*, 349, 293-299) hergestellt werden.

- 5 Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Arzneimittel, das eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäßes Polypeptid und gegebenenfalls geeignete Zusatz- oder Hilfsstoffe enthält und ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Herzerkrankungen, insbesondere von Herzinsuffizienz, bei dem eine erfindungsgemäße  
10 Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäßes Polypeptid mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger formuliert wird.

Für die gentherapeutische Anwendung beim Menschen ist vor allem ein Arzneimittel geeignet, das die erfindungsgemäße Nukleinsäure in nackter  
15 Form oder in Form eines der oben beschriebenen gentherapeutisch wirksamen Vektoren oder in mit Liposomen komplexierter Form enthält. Der pharmazeutische Träger ist beispielsweise eine physiologische Pufferlösung, vorzugsweise mit einem pH von ca. 6,0-8,0, vorzugsweise von ca. 6,8-7,8, insbesondere von ca. 7,4 und/oder einer Osmolarität von ca. 200-400  
20 milliosmol/Liter, vorzugsweise von ca. 290-310 milliosmol/Liter. Zusätzlich kann der pharmazeutische Träger geeignete Stabilisatoren, wie z. B. Nukleaseinhibitoren, vorzugsweise Komplexbildner wie EDTA und/oder andere dem Fachmann bekannte Hilfsstoffe enthalten.

- 25 Die Verabreichung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure gegebenenfalls in Form der oben näher beschriebenen Virusvektoren oder als Liposomenkomplexe erfolgt üblicherweise intravenös, z. B. mit Hilfe eines Katheters. Vorteilhaft ist beispielsweise die direkte Infusion der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in die Koronararterien des Patienten (sog. "Percutaneous  
30 Coronary Gene Transfer", PCGT), insbesondere in Form von rekombinanten



Adenovirusvektoren oder Adenoassoziierten Virusvektoren. Besonders bevorzugt ist die Verabreichung mit Hilfe eines Ballonkatheters, da hierdurch die Transfektion nicht nur auf das Herz, sondern auch innerhalb des Herzens auf die Injektionsstelle begrenzt werden kann (siehe z. B. Feldman, L. J. et al. (1994) *JACC* 235A, 906-934).

Es ist auch möglich, das Polypeptid selbst intravenös oder mit Hilfe eines Katheters oder Ballonkatheters gegebenenfalls mit geeigneten Zusatz- oder Hilfsstoffen, wie z.B. physiologische Kochsalzlösung, Stabilisatoren, Proteinaseinhibitoren etc., zu verabreichen, um die Funktion des Herzens sofort und unmittelbar zu beeinflussen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Diagnostikum enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder erfindungsgemäße Antikörper und gegebenenfalls geeignete Zusatz- oder Hilfsstoffe und ein Verfahren zur Herstellung eines Diagnostikums zur Diagnose von Herzerkrankungen, insbesondere Herzinsuffizienz, bei dem eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder erfindungsgemäße Antikörper mit geeigneten Zusatz- oder Hilfsstoffe versetzt wird.

Beispielsweise können gemäß der vorliegenden Erfindung anhand der erfindungsgemäßen Nukleinsäure ein Diagnostikum auf der Basis der Polymerasekettenreaktion (PCR-Diagnostik, z. B. gemäß EP-0 200 362) oder eines Northern-Blots, wie in Beispiel 3 unter Verwendung des erfindungsgemäßen 321 bp DNA-Fragmentes als Sonde näher dargestellt, hergestellt werden. Diese Tests beruhen auf der spezifischen Hybridisierung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit dem komplementären Gegenstrang üblicherweise der entsprechenden mRNA. Die erfindungsgemäße Nukleinsäure kann hierbei auch modifiziert sein, wie z. B. in EP 0 063 879 beschrieben. Vorzugs-

weise wird ein erfindungsgemäßes DNA-Fragment, insbesondere das in Beispiel 1 beschriebene DNA-Fragment mittels geeigneter Reagenzien, z. B. radioaktiv mit  $\alpha$ -P<sup>32</sup>-dCTP oder nicht-radioaktiv mit Biotin, nach allgemein bekannten Methoden markiert und mit isolierter RNA, die vorzugsweise  
5 vorher an geeignete Membranen aus z. B. Cellulose oder Nylon gebunden wurde, inkubiert. Zudem ist es vorteilhaft die isolierte RNA vor der Hybridisierung und Bindung an eine Membran der Größe nach, z. B. mittels Agarose-Gelelektrophorese, aufzutrennen. Bei gleicher Menge an untersuchter RNA aus jeder Gewebeprobe kann somit die Menge an mRNA bestimmt  
10 werden, die spezifisch durch die Sonde markiert wurde.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Diagnostikums kann somit auch eine Gewebeprobe des Herzens in vitro auf die Expressionsstärke des korrespondierenden Gens spezifisch gemessen werden, um eine mögliche Herzinsuffizienz sicher diagnostizieren zu können (siehe Beispiel 1). Insbesondere eignet  
15 sich eine cDNA mit einer Sequenz gemäß Fig. 1 für die Diagnose einer möglichen Herzinsuffizienz (siehe Beispiel 2).

Ein weiteres Diagnostikum enthält das erfindungsgemäße Polypeptid bzw. die  
20 oben näher beschriebenen immunogenen Teile davon. Das Polypeptid bzw. die Teile davon, die vorzugsweise an eine Festphase, z. B. aus Nitrocellulose oder Nylon, gebunden sind, können beispielsweise mit der zu untersuchenden Körperflüssigkeit, z. B. Blut, in vitro in Berührung gebracht werden, um so beispielsweise mit Autoimmunantikörper reagieren zu können.  
25 Der Antikörper-Peptid-Komplex kann anschließend beispielsweise anhand markierter Antihuman-IgG- oder Antihuman-IgM-Antikörper nachgewiesen werden. Bei der Markierung handelt es sich beispielsweise um ein Enzym, wie Peroxidase, das eine Farbreaktion katalysiert. Die Anwesenheit und die Menge an anwesenden Autoimmunantikörper kann somit über die Farbreaktion leicht und schnell nachgewiesen werden.  
30

Ein anderes Diagnostikum enthält die erfindungsgemäßen Antikörper selbst. Mit Hilfe dieser Antikörper kann beispielsweise eine Gewebeprobe des Herzens leicht und schnell dahingehend untersucht werden, ob das betreffende Polypeptid in einer erhöhten Menge vorhanden ist, um dadurch einen Hinweis auf eine mögliche Herzinsuffizienz zu erhalten. In diesem Fall sind die erfindungsgemäßen Antikörper beispielsweise mit einem Enzym, wie oben bereits beschrieben, markiert. Der spezifische Antikörper-Peptid-Komplex kann dadurch leicht und ebenso schnell über eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen werden.

Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft einen Test zur Identifizierung funktioneller Interaktoren enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder die erfindungsgemäßen Antikörper und gegebenenfalls geeignete Zusatz- oder Hilfsstoffe.

Ein geeigneter Test zur Identifizierung funktioneller Interaktoren ist z. B. das sogenannte "*Two-Hybrid System*" (Fields, S. & Sternglanz, R. (1994) *Trends in Genetics*, 10, 286-292).

Bei diesem Test wird eine Zelle, beispielsweise eine Hefezelle, mit einem oder mehreren Expressionsvektoren transformiert oder transfiziert, die ein Fusionsprotein exprimieren, das das erfindungsgemäße Polypeptid und eine DNA-Bindedomäne eines bekannten Proteins, beispielsweise von Gal4 oder LexA aus *E. coli*, enthält, und/oder ein Fusionsprotein exprimiert, das ein unbekanntes Polypeptid und eine Transkriptions-Aktivierungsdomäne, beispielsweise von Gal4, Herpes Virus VP16 oder B42, enthält. Zudem enthält die Zelle ein Reportergen, beispielsweise das lacZ-Gen aus *E. coli*, "green fluorescence protein" oder die Aminosäure-Biosynthesegene der Hefe His3 oder Leu2, das durch regulatorische Sequenzen, wie z. B. den lexA-Promotor/Operator oder durch eine sogenannte "upstream activation sequence"

(UAS) der Hefe, kontrolliert wird. Das unbekannte Polypeptid wird beispielsweise durch ein DNA-Fragment kodiert, das aus einer Genbank, beispielsweise aus einer Herzgewebe-spezifischen Genbank des Menschen, stammt. Üblicherweise wird gleich eine c-DNA-Genbank mit Hilfe der  
5 beschriebenen Expressionsvektoren in Hefe hergestellt, so daß der Test unmittelbar danach durchgeführt werden kann.

Beispielsweise wird in einen Hefe-Expressionsvektor die erfindungsgemäße Nukleinsäure in funktioneller Einheit an die Nukleinsäure kodierend für die  
10 LexA-DNA-Bindedomäne kloniert, so daß ein Fusionsprotein aus dem erfindungsgemäßen Polypeptid und der LexA-DNA-Bindedomäne in der transformierten Hefe exprimiert wird. In einem anderen Hefe-Expressionsvektor werden c-DNA-Fragmente aus einer c-DNA-Genbank in funktioneller Einheit an die Nukleinsäure kodierend für die Gal4-Transkriptions-Aktivierungsdomäne  
15 ne kloniert, so daß ein Fusionsprotein aus einem unbekannten Polypeptid und der Gal4-Transkriptions-Aktivierungsdomäne in der transformierten Hefe exprimiert wird. Die mit beiden Expressionsvektoren transformierte Hefe, die beispielsweise Leu2<sup>-</sup> ist, enthält zusätzlich eine Nukleinsäure, die für Leu2 kodiert, und durch den LexA-Promotor/Operator kontrolliert wird. Im Falle  
20 einer funktionellen Interaktion zwischen dem erfindungsgemäßen Polypeptid und dem unbekannten Polypeptid bindet die Gal4-Transkriptions-Aktivierungsdomäne über die LexA-DNA-Bindedomäne an den LexA-Promotor/Operator, wodurch dieser aktiviert und das Leu2-Gen exprimiert wird. Dies hat zur Folge, daß die Leu2<sup>-</sup> Hefe auf Minimalmedium, das kein Leucin enthält,  
25 wachsen kann.

Bei Verwendung des lacZ-bzw. "green fluorescence protein"-Reportergens anstelle eines Aminosäure-Biosynthesegens kann die Aktivierung der Transkription dadurch nachgewiesen werden, daß sich blaue bzw. grün-fluoreszierende Kolonien bilden. Die Blau- bzw. Fluoreszenzfärbung läßt sich auch  
30

leicht im Spektrophotometer z. B. bei 585 nm im Falle einer Blaufärbung quantifizieren.

Auf diese Weise können Expressionsgenbanken leicht und schnell auf Polypeptide durchsucht werden, die mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid interagieren. Anschließend können die gefundenen neuen Polypeptide isoliert und weiter charakterisiert werden.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit des "*Two-Hybrid Systems*" ist die Beeinflussung der Interaktion zwischen dem erfindungsgemäßen Polypeptid und einem bekannten oder unbekannten Polypeptid durch weitere Substanzen, wie z. B. chemische Verbindungen. Auf diese Weise lassen sich auch leicht neue und wertvolle, chemisch synthetisierbare Wirkstoffe auffinden, die als Therapeutikum zur Behandlung einer Herzerkrankung eingesetzt werden können. Die vorliegende Erfindung ist daher nicht nur auf ein Verfahren zum Auffinden von Polypeptid-artigen Interaktoren beschränkt, sondern erstreckt sich auch auf ein Verfahren zum Auffinden von Substanzen, die mit dem oben beschriebenen Protein-Protein-Komplex interagieren können. Derartige Polypeptid-artige, wie auch chemische Interaktoren werden daher im Sinne der vorliegenden Erfindung als funktionelle Interaktoren bezeichnet.

Der überraschende Vorteil der vorliegenden Erfindung ist somit, daß mit Hilfe der erfindungsgemäßen Gegenstände Herzerkrankungen, insbesondere die Herzinsuffizienz, spezifisch und sicher diagnostiziert und therapiert werden können. Es ergeben sich jedoch auch weitere wertvolle therapeutische und diagnostische Möglichkeiten. Beispielsweise sind die mit den beschriebenen Testverfahren leicht aufzuspürenden funktionelle Interaktoren deshalb so vorteilhaft, weil mit deren Hilfe in Form von geeigneten Arzneimitteln die Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids in seiner natürlichen Umgebung im Herzmuskel und somit auch die Kontraktionsfähigkeit der Herzmuskelzel-

len gezielt beeinflusst werden kann, insbesondere da die Aktivität dieses Polypeptids, wie oben bereits näher beschrieben, reguliert werden kann.

- 5 Die nachfolgenden Abbildungen und Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern ohne sie zu beschränken.

#### Beschreibung der Abbildungen

10

Fig. 1 zeigt eine 1936 Nukleotide-lange herzspezifische DNA-Sequenz. Der Bereich, der für das entsprechende Polypeptid kodiert, ist in Fettdruck dargestellt. Das DNA-Fragment aus Beispiel 1 ist unterstrichen.

15

Fig. 2 zeigt eine 2080 Nukleotide-lange herzspezifische DNA-Sequenz, die eine Verlängerung am 5'-Ende der DNA-Sequenz aus Fig. 1 aufweist. Der Bereich, der für das entsprechende Polypeptid kodiert, ist wiederum in Fettdruck dargestellt.

20

Fig. 3 zeigt eine 2268 Nukleotide-lange herzspezifische DNA-Sequenz, die eine Verlängerung am 5'-Ende der DNA-Sequenz aus Fig. 1 bzw. Fig. 2 aufweist. Der Bereich, der für das entsprechende Polypeptid kodiert, ist ebenso in Fettdruck dargestellt.

25

Fig. 4 zeigt eine 552 Aminosäuren-lange Polypeptid-Sequenz, die von einer der DNA-Sequenzen gemäß Fig. 1-3 kodiert wird. Die zu humanem Tropomodulin homologen Bereiche sind in Fettdruck dargestellt. Die Sequenzmotive, die auf eine Regulation des Polypeptides durch Tyrosinkinase-Signaltransduktionswege hinweisen, sind unterstrichen.

30

Fig. 5a und 5b zeigen Northern-Blots von mRNAs, die zu den Nukleinsäuresequenzen gemäß Fig. 1-3 korrespondieren, zum Nachweis der Expression in verschiedenen menschlichen Geweben (Fig. 5a) und zum Nachweis der Expression in gesundem und insuffizientem menschlichen Herzgewebe (Fig. 5b).

### Beispiele

10

#### 1. Isolierung eines DNA-Fragments aus humanem insuffizientem Herzgewebe

Aus einer gesunden und einer insuffizienten Herzgewebe-Probe wurde zunächst durch Standardmethoden (Chomczynski & Sacchi (1987), *Anal. Biochem.*, 162 (1), 156-159) Gesamt-RNA isoliert. Die RNA wurde dann mit DNase behandelt, um DNA-Kontaminationen zu entfernen. Ein Aliquot dieser RNA (0,2 µg) wurde dann in einem 20 µl-Reaktionsmix mit 1 x RT-Puffer (Gibco Y00121), 10 mM DTT, 20 µM dNTP-Mix, 1U/µl RNasin (Promega N2511), 1 µM 3'-Anker-Primergemisch vom Typ 5'-T<sub>12</sub>ACN-3', wobei N ein beliebiges desoxy-Nukleotid sein kann und 10U/µl SuperScript RNase H<sup>-</sup> reverser Transkriptase 60 min bei 37°C inkubiert und somit in cDNA umgeschrieben. Ein cDNA-Aliquot wurde anschließend einer 20 µl-PCR-Reaktion in 1x PCR-Puffer (Perkin-Elmer) unterworfen, die neben 1µM 3'-Primer T<sub>12</sub>AC und 1µM 5'-Dekamer-Primer (5'-CCTTCTACCC-3'), 10 µCi α-P<sup>33</sup>-dCTP, 2µM dNTP-Mix und 1 U AmpliTaq (Perkin Elmer) enthält. Das Gemisch wurde zunächst 1 min bei 94°C, dann 40 Zyklen mit jeweils 30 s 94°C, 2 min 40°C und 30 s 72°C und abschließend 10 min bei 72°C inkubiert. Das entstehende DNA-Fragment-Gemisch wurde dann auf einem 6%igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und autoradiographiert. Es wird

30

so ein 321 bp großes DNA-Fragment dargestellt, welches nicht in der  
Gesundherzprobe, jedoch deutlich in der insuffizienten Herzprobe vorhanden  
ist. Dieses Fragment wurde dann anhand des Röntgenfilmes aus dem Gel  
ausgeschnitten und mittels PCR unter den bereits beschriebenen Bedingungen  
5 reamplifiziert. Das erhaltene Fragment wurde dann in einen entsprechenden  
Vektor kloniert, und die DNA-Sequenz wurde bestimmt. Ein derartig darge-  
stelltes Fragment enthält die Nukleotide 1627-1936 der Sequenz gemäß  
Anspruch 1 und die 12 Thymin-Nukleotide aus dem 3'-Anker-Primer.

10

## 2. Isolierung von herzspezifischen Nukleinsäuren

Mit Hilfe eines  $\alpha$ -P<sup>32</sup>-dCTP markierten DNA-Fragmentes aus Beispiel 1, das  
die Nukleotide von Position 1627-1936 nach Fig. 1 umfaßt, wurde eine  
15 Plaquehybridisierung mit einer cDNA-Genbank aus Herzgewebe nach Stan-  
dardbedingungen durchgeführt (siehe Sambrook, J., Frisch, E. F. & Mania-  
tis, T. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Kap. 8-10). An-  
schließend wurden die gefundenen cDNAs isoliert und sequenziert. Die  
Sequenzen sind in Fig. 1-3 dargestellt. Hierbei zeigte sich, daß sich die  
20 cDNA mit der Sequenz gemäß Fig. 1 mit größerer Wahrscheinlichkeit aus  
insuffizientem Herzgewebe isolieren ließ als die cDNA mit der Sequenz  
gemäß Fig. 2 oder 3, welche sich mit größerer Wahrscheinlichkeit aus  
gesundem Herzgewebe isolieren ließ.

25



3. Nachweis der Expressionsstärke des herzspezifischen Gens in verschiedenen menschlichen Geweben anhand von Northern Blots.

5 Das bereits in den Beispielen 1 und 2 und Fig. 1 beschriebene 321 bp große DNA-Fragment wurde zunächst mit  $\alpha$ -P<sup>32</sup>-dCTP mittels der "random primer labeling"-Methode (Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1983) Anal. Biochem., 132, 6) radioaktiv markiert. Hierzu wurde das RTS RadPrime DNA Labeling System (GibcoBRL 10387-017) verwendet. Die Hybridisierung  
10 von Blots mit poly A<sup>+</sup>-RNA aus menschlichen Geweben (siehe Fig. 5a und 5b) fand nach Herstellerangaben (Multiple Tissue Northern Blots I & II, Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg, #7760-1, #7759-1) in ExpressHyb Hybridisierungslösung (Clontech #8015-1) 1 Stunde bei 68 °C statt. Die Blots wurden anschließend 30 Minuten mit 2 x SSC und 0,05% SDS und  
15 danach 1 Stunde mit 0,1 x SSC und 0,1% SDS gewaschen und autoradiographiert. Es zeigte sich, daß die 321 bp große Sonde mit einer polyA<sup>+</sup>-RNA von ca. 2400 bp stark in Herzgewebe und Skelettmuskel, sehr schwach in Prostatagewebe und nicht in Leukozyten, Dickdarm-, Dünndarm-, Eierstock-, Hoden-, Thymus-, Milz-, Niere-, Leber-, Lunge-, Plazenta- und  
20 Gehirngewebe hybridisiert (Fig. 5a).

Weiterhin wurde die Expression der entsprechenden RNAs in gesundem und insuffizientem Herzgewebe untersucht. Hierzu wurde aus verschiedenen menschlichen Herzgewebeproben Gesamt-RNA isoliert (Chomczynski &  
25 Sacchi (1987), Anal. Biochem. 162, 156-159). Anschließend wurden jeweils 10 µg RNA mittels eines 1%igen Formaldehyd-Agarose Gels aufgetrennt und im Kapillarverfahren auf eine geladene Nylon-Membran transferiert (Zeta-Probe GT BioRad #162-0197). Die Membran wurde kurz mit 2 x SSC gewaschen und dann bei 80 °C 30 Minuten gebacken. Die Membranen  
30 wurden mindestens 1 Stunde mit Prähybridisierlösung (0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH

7,2; 7% SDS) bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung gegen eine frische Lösung ausgetauscht und die radioaktive, hitzedenaturierte Sonde hinzugegeben. Die Hybridisierung wurde 15 Stunden bei 65 °C durchgeführt. Anschließend wurden die Membranen zunächst 15 Stunden bei 65 °C mit 40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2; 5% SDS, dann 2 x 30 Minuten bei 65 °C mit 40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2; 1% SDS gewaschen und anschließend autoradiografiert. Es zeigte sich, daß in 1%igen Agarose-Gelen verschiedene RNA-Spezien aufgetrennt wurden, die eine Größe von ca. 2200 bis ca. 2400 bp aufwiesen. Diese unterschiedlichen Spezies korrespondieren gut mit den Größen der drei gefundenen cDNAs inklusive eines durchschnittlichen polyA-Schwanzes von 150 bp Länge (siehe Fig. 1-3). Insbesondere die kleinste RNA-Spezies war im erkrankten Gewebe deutlicher nachzuweisen als im gesunden Gewebe. Die Quantifizierung der Blots mittels Phosphoimagers und der ImageQuant Software (Molecular Dynamics GmbH, Krefeld) unter Berücksichtigung einer Kontrollhybridisierung mit  $\beta$ 4-Thymosin und Aktin ergab eine um ungefähr 35% erhöhte Expression der nachgewiesenen RNAs in insuffizientem Herzgewebe im Vergleich zum gesunden Gewebe.

MediGene Aktiengesellschaft

13. Juni 1997

M25519/BÖ

Patentansprüche

5

1. Nukleinsäure kodierend für ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz gemäß Fig. 4 oder eine funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 8 Nukleotiden.
- 10 2. Nukleinsäure nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine DNA oder RNA, vorzugsweise eine DNA, insbesondere eine doppelsträngige DNA ist.
- 15 3. Nukleinsäure nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine DNA mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß Fig. 1, 2 oder 3 enthält.
- 20 4. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure in einem Vektor, vorzugsweise in einem Expressionsvektor oder gentherapeutisch wirksamen Vektor, enthalten ist.
- 25 5. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß der Teil der Nukleinsäure, der für das Polypeptid kodiert, eine oder mehrere nicht-kodierende Sequenzen und/oder eine polyA-Sequenz enthält.
- 30 6. Verfahren zur Herstellung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure chemisch synthetisiert oder anhand einer Sonde aus einer Genbank isoliert wird.

7. Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz gemäß Fig. 4 oder eine funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 6 Aminosäuren.
- 5 8. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-3 in einer geeigneten Wirtszelle exprimiert wird.
- 10 9. Antikörper gegen ein Polypeptid gemäß Anspruch 7.
10. Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß ein Säugetier mit einem Polypeptid gemäß Anspruch 7 immunisiert und die entstandenen  
15 Antikörper isoliert werden.
11. Arzneimittel enthaltend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-5 oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 7 und gegebenenfalls einen pharmazeutisch annehmbaren Träger.
- 20 12. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Herzerkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-5 oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 7 mit einem pharmazeutisch annehmbaren  
25 Träger formuliert wird.
13. Diagnostikum enthaltend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-5, ein Polypeptid gemäß Anspruch 7 oder Antikörper gemäß Anspruch 9 und gegebenenfalls geeignete Zusatz-  
30 oder Hilfsstoffe.

14. Verfahren zur Herstellung eines Diagnostikums zur Diagnose von Herzerkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-5, ein Polypeptid gemäß Anspruch 7 oder Antikörper gemäß Anspruch 9 mit  
5 einem pharmazeutisch annehmbaren Träger versetzt wird.
15. Test zur Identifizierung funktioneller Interaktoren enthaltend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-5 oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 7 und gegebenenfalls geeignete  
10 Zusatz- oder Hilfsstoffe.
16. Verwendung einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-5 oder eines Polypeptids gemäß Anspruch 7 zur Identifizierung funktioneller Interaktoren.  
15

Fig. 1

	CAGCCTGCCA	CTTGCCTCCC	TGCCTGCTTC	TGGCTGCCTT
	GAATGCCTGG	TCCTTCAAGC	TCCTTCTGGG	TCTGACAAAG
5	CAGGGACCAT	GTCTACCTTT	GGCTACCGAA	GAGGACTCAG
	TAAATACGAA	TCCATCGACG	AGGATGAACT	CCTCGCCTCC
	CTGTCAGCCG	AGGAGCTGAA	GGAGCTAGAG	AGAGAGTTGG
	AAGACATTGA	ACCTGACCGC	AACCTTCCCG	TGGGGCTAAG
	GCAAAAGAGC	CTGACAGAGA	AAACCCCCAC	AGGGACATTC
10	AGCAGAGAGG	CACTGATGGC	CTATTGGGAA	AAGGAGTCCC
	AAAAACTCTT	GGAGAAGGAG	AGGCTGGGGG	AATGTGGAAA
	GGTTGCAGAA	GACAAAGAGG	AAAGTGAAGA	AGAGCTTATC
	TTTACTGAAA	GTAACAGTGA	GGTTTCTGAG	GAAGTGTATA
	CAGAGGAGGA	GGAGGAGGAG	TCCCAGGAGG	AAGAGGAGGA
15	AGAAGACAGT	GACGAAGAGG	AAAGAACAAT	TGAAACTGCA
	AAAGGGATTA	ATGGAAGTGT	AAATTATGAT	AGTGTCAATT
	CTGACAACTC	TAAGCCAAAG	ATATTTAAAA	GTCAAATAGA
	GAACATAAAT	TTGACCAATG	GCAGCAATGG	GAGGAACACA
	GAGTCCCCAG	CTGCCATTCA	CCCTTGTGGA	AATCCTACAG
20	TGATTGAGGA	CGCTTTGGAC	AAGATTAAAA	GCAATGACCC
	TGACACCACA	GAAGTCAATT	TGAACAACAT	TGAGAACATC
	ACAACACAGA	CCCTTACCCG	CTTTGCTGAA	GCCCTCAAGG
	ACAACACTGT	GGTGAAGACG	TTCAGTCTGG	CCAACACGCA
	TGCCGACGAC	AGTGCAGCCA	TGGCCATTGC	AGAGATGCTC
25	AAAGCCAATG	AGCACATCAC	CAACGTAAAC	GTCGAGTCCA
	ACTTCATAAC	GGGAAAGGGG	ATCCTGGCCA	TCATGAGAGC
	TCTCCAGCAC	AACACGGTGC	TCACGGAGCT	GCGTTTCCAT
	AACCAGAGGC	ACATCATGGG	CAGCCAGGTG	GAAATGGAGA
	TTGTCAAGCT	GCTGAAGGAG	AACACGACGC	TGCTGAGGCT
30	GGGATACCAT	TTTGAAGTCC	CAGGACCAAG	AATGAGCATG

	ACGAGCATTT	TGACAAGAAA	TATGGATAAA	CAGAGGCAAA
	AACGTTTGCA	GGAGCAAAAA	CAGCAGGAGG	GATACGATGG
	AGGACCCAAT	CTTAGGACCA	AAGTCTGGCA	AAGAGGAACA
	CCTAGCTCTT	CACCTTATGT	ATCTCCCAGG	CACTCACCCCT
5	GGTCATCCCC	AAAAC TCCCC	AAAAAAGTCC	AGACTGTGAG
	GAGCCGTCCT	CTGTCTCCTG	TGGCCACACT	TCCTCCTCCT
	CCCCCTCCTC	CTCCTCCTCC	CCCTCCTTCT	TCCCAAAGGC
	TGCCACCACC	TCCTCCTCCT	CCCCCTCCTC	CACTCCCAGA
	GAAAAAGCTC	ATTACCAGAA	ACATTGCAGA	AGTCATCAAA
10	CAACAGGAGA	GTGCCCAACG	GGCATTACAA	AATGGACAAA
	AAAAGAAAAA	AGGGAAAAAAG	GTCAAGAAAC	AGCCAAACAG
	TATTCTAAAG	GAAATAAAAA	ATTCTCTGAG	GTCAGTGCAA
	GAGAAGAAAA	TGGAAGACAG	TTCCCGACCT	<u>TCTACCCAC</u>
	<u>AGAGATCAGC</u>	<u>TCATGAGAAT</u>	<u>CTCATGGAAG</u>	<u>CAATTCGGGG</u>
15	<u>AAGCAGCATA</u>	<u>AAACAGCTAA</u>	<u>AGCGGGTGGA</u>	<u>AGTTCAGAA</u>
	<u>GCCCTGCGAT</u>	<u>GGGAACATGA</u>	<u>TCTTTAGAAG</u>	<u>AGGATGCAGA</u>
	<u>ACTGTTTCAGT</u>	<u>GGTATTACAT</u>	<u>GAAATGCATT</u>	<u>GTGAGATGTT</u>
	<u>TCTAAAATAC</u>	<u>CTTCTTCAAT</u>	<u>TCAAAATGAT</u>	<u>CCCTGACTTT</u>
	<u>AAAAATAATC</u>	<u>TCACCCATTA</u>	<u>ATTCCAAAGA</u>	<u>GAATCTTAAG</u>
20	<u>AAACAATCAG</u>	<u>CATGTTTCTT</u>	<u>CTGTAAATAT</u>	<u>GAAAATAAAT</u>
	<u>TTCTTTTTTA</u>	<u>TGTCGT-poly(A)-Schwanz</u>		

Fig. 2

	CAGCCTGCCA	CTTGCCTCCC	TGCCTGCTTC	TGGCTGCCTT
	GAATGCCTGG	TCCTTCAAGC	TCCTTCTGGG	TCTGACAAAG
5	CAGGGACCAT	GTCTACCTTT	GGCTACCGAA	GAGGACTCAG
	TAAATACGAA	TCCATCGACG	AGGATGAACT	CCTCGCCTCC
	CTGTCAGCCG	AGGAGCTGAA	GGAGCTAGAG	AGAGAGTTGG
	AAGACATTGA	ACCTGACCGC	AACCTTCCCG	TGGGGCTAAG
	GCAAAAGAGC	CTGACAGAGA	AAACCCCCAC	AGGGACATTC
10	AGCAGAGAGG	CACTGATGGC	CTATTGGGAA	AAGGAGTCCC
	AAAAACTCTT	GGAGAAGGAG	AGGCTGGGGG	AATGTGGAAA
	GGTTGCAGAA	GACAAAGAGG	AAAGTGAAGA	AGAGCTTATC
	TTTACTGAAA	GTAACAGTGA	GGTTTCTGAG	GAAGTGTATA
	CAGAGGAGGA	GGAGGAGGAG	TCCCAGGAGG	AAGAGGAGGA
15	AGAAGACAGT	GACGAAGAGG	AAAGAACAAT	TGAAACTGCA
	AAAGGGATTA	ATGGAACTGT	AAATTATGAT	AGTGTCAATT
	CTGACAACTC	TAAGCCAAAG	ATATTTAAAA	GTCAAATAGA
	GAACATAAAT	TTGACCAATG	GCAGCAATGG	GAGGAACACA
	GAGTCCCCAG	CTGCCATTCA	CCCTTGTGGA	AATCCTACAG
20	TGATTGAGGA	CGCTTTGGAC	AAGATTAAAA	GCAATGACCC
	TGACACCACA	GAAGTCAATT	TGAACAACAT	TGAGAACATC
	ACAACACAGA	CCCTTACCCG	CTTTGCTGAA	GCCCTCAAGG
	ACAACACTGT	GGTGAAGACG	TTCAGTCTGG	CCAACACGCA
	TGCCGACGAC	AGTGCAGCCA	TGGCCATTGC	AGAGATGCTC
25	AAAGCCAATG	AGCACATCAC	CAACGTAAAC	GTCGAGTCCA
	ACTTCATAAC	GGGAAAGGGG	ATCCTGGCCA	TCATGAGAGC
	TCTCCAGCAC	AACACGGTGC	TCACGGAGCT	GCGTTTCCAT
	AACCAGAGGC	ACATCATGGG	CAGCCAGGTG	GAAATGGAGA
	TTGTCAAGCT	GCTGAAGGAG	AACACGACGC	TGCTGAGGCT
30	GGGATACCAT	TTTGAACTCC	CAGGACCAAG	AATGAGCATG
	ACGAGCATTT	TGACAAGAAA	TATGGATAAA	CAGAGGCAAA



	AACGTTTGCA	GGAGCAAAAA	CAGCAGGAGG	GATACGATGG
	AGGACCCAAT	CTTAGGACCA	AAGTCTGGCA	AAGAGGAACA
	CCTAGCTCTT	CACCTTATGT	ATCTCCCAGG	CACTCACCT
	GGTCATCCCC	AAAACCTCCCC	AAAAAAGTCC	AGACTGTGAG
5	GAGCCGTCCT	CTGTCTCCTG	TGGCCACACT	TCCTCCTCCT
	CCCCCTCCTC	CTCCTCCTCC	CCCTCCTTCT	TCCCAAAGGC
	TGCCACCACC	TCCTCCTCCT	CCCCCTCCTC	CACTCCCAGA
	GAAAAAGCTC	ATTACCAGAA	ACATTGCAGA	AGTCATCAAA
	CAACAGGAGA	GTGCCCAACG	GGCATTACAA	AATGGACAAA
10	AAAAGAAAAA	AGGGAAAAAAG	GTCAAGAAAC	AGCCAAACAG
	TATTCTAAAG	GAAATAAAAA	ATTCTCTGAG	GTCAGTGCAA
	GAGAAGAAAA	TGGAAGACAG	TTCCCGACCT	TCTACCCAC
	AGAGATCAGC	TCATGAGAAT	CTCATGGAAG	CAATTCGGGG
	AAGCAGCATA	AAACAGCTAA	AGCGGGTGGA	AGTTCCAGAA
15	GCCCTGCGAT	GGGAACATGA	TCTTTAGAAG	AGGATGCAGA
	ACTGTTTCAGT	GGTATTACAT	GAAATGCATT	GTGAGATGTT
	TCTAAAATAC	CTTCTTCAAT	TCAAAATGAT	CCCTGACTTT
	AAAAATAATC	TCACCCATTA	ATTCCAAAGA	GAATCTTAAG
	AAACAATCAG	CATGTTTCTT	CTGTAAATAT	GAAAATAAAT
20	TTCTTTTTTA	TGTCGTGAGA	TTTGTATTGG	CAAGAAGCAG
	TTAATTTAAA	GATGCTCTTC	CTATCTGTGG	ATGTGTTGGT
	AACTCCGAGT	TGTAATGAGT	TCATGAAATG	TGCTGTTATT
	TTTGTAATCT	CAATAAATGT	GGATTGAAGT	TTTTTCCCTT

-poly(A)-Schwanz

Fig 3

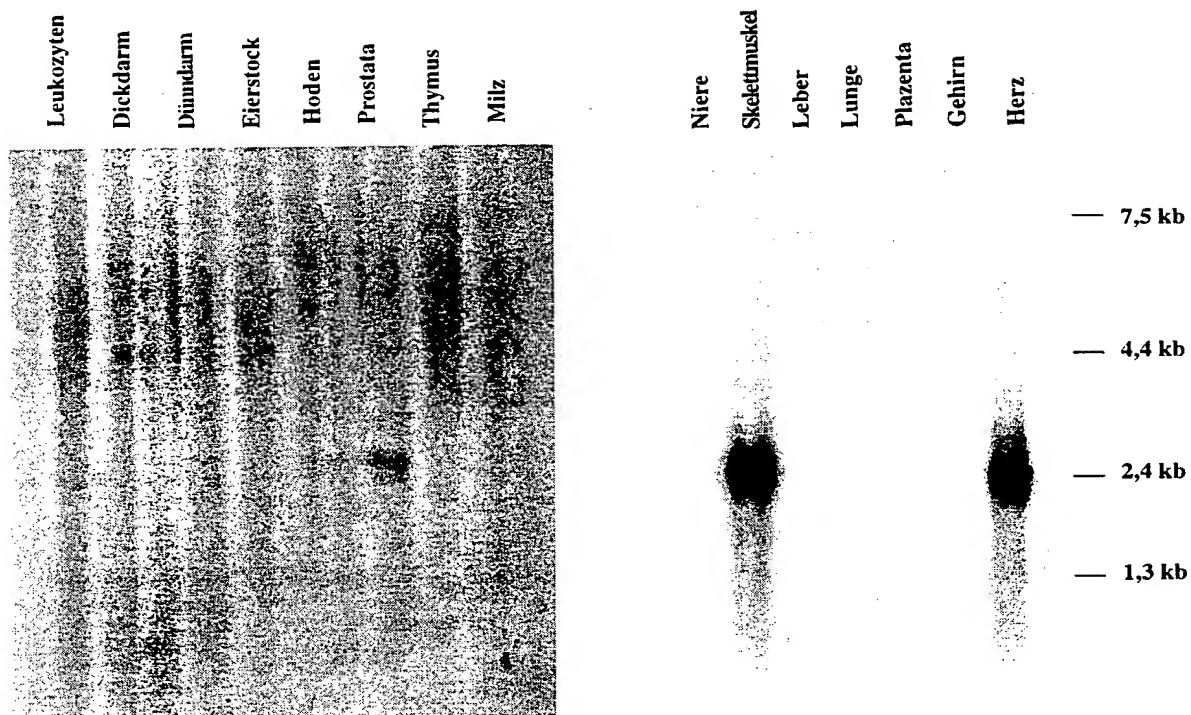
	CAGCCTGCCA	CTTGCCTCCC	TGCCTGCTTC	TGGCTGCCTT
5	GAATGCCTGG	TCCTTCAAGC	TCCTTCTGGG	TCTGACAAAG
	CAGGGACCAT	GTCTACCTTT	GGCTACCGAA	GAGGACTCAG
	TAAATACGAA	TCCATCGACG	AGGATGAACT	CCTCGCCTCC
	CTGTCAGCCG	AGGAGCTGAA	GGAGCTAGAG	AGAGAGTTGG
	AAGACATTGA	ACCTGACCGC	AACCTTCCCG	TGGGGCTAAG
10	GCAAAAGAGC	CTGACAGAGA	AAACCCCCAC	AGGGACATTC
	AGCAGAGAGG	CACTGATGGC	CTATTGGGAA	AAGGAGTCCC
	AAAAACTCTT	GGAGAAGGAG	AGGCTGGGGG	AATGTGGAAA
	GGTTGCAGAA	GACAAAGAGG	AAAGTGAAGA	AGAGCTTATC
	TTTACTGAAA	GTAACAGTGA	GGTTTCTGAG	GAAGTGTATA
15	CAGAGGAGGA	GGAGGAGGAG	TCCCAGGAGG	AAGAGGAGGA
	AGAAGACAGT	GACGAAGAGG	AAAGAACAAT	TGAAACTGCA
	AAAGGGATTA	ATGGAAGTGT	AAATTATGAT	AGTGTCAATT
	CTGACAACTC	TAAGCCAAAG	ATATTTAAAA	GTCAAATAGA
	GAACATAAAT	TTGACCAATG	GCAGCAATGG	GAGGAACACA
20	GAGTCCCCAG	CTGCCATTCA	CCCTTGTGGA	AATCCTACAG
	TGATTGAGGA	CGCTTTGGAC	AAGATTAAAA	GCAATGACCC
	TGACACCACA	GAAGTCAATT	TGAACAACAT	TGAGAACATC
	ACAACACAGA	CCCTTACCCG	CTTTGCTGAA	GCCCTCAAGG
	ACAACACTGT	GGTGAAGACG	TTCAGTCTGG	CCAACACGCA
25	TGCCGACGAC	AGTGCAGCCA	TGGCCATTGC	AGAGATGCTC
	AAAGCCAATG	AGCACATCAC	CAACGTAAAC	GTCGAGTCCA
	ACTTCATAAC	GGGAAAGGGG	ATCCTGGCCA	TCATGAGAGC
	TCTCCAGCAC	AACACGGTGC	TCACGGAGCT	GCGTTTCCAT
	AACCAGAGGC	ACATCATGGG	CAGCCAGGTG	GAAATGGAGA
30	TTGTCAAGCT	GCTGAAGGAG	AACACGACGC	TGCTGAGGCT
	GGGATACCAT	TTTGAAGTCC	CAGGACCAAG	AATGAGCATG

	ACGAGCATTT	TGACAAGAAA	TATGGATAAA	CAGAGGCAAA
	AACGTTTGCA	GGAGCAAAAA	CAGCAGGAGG	GATACGATGG
	AGGACCCAAT	CTTAGGACCA	AAGTCTGGCA	AAGAGGAACA
	CCTAGCTCTT	CACCTTATGT	ATCTCCCAGG	CACTCACCT
5	GGTCATCCCC	AAAACCTCCCC	AAAAAAGTCC	AGACTGTGAG
	GAGCCGTCCT	CTGTCTCCTG	TGGCCACACT	TCCTCCTCCT
	CCCCCTCCTC	CTCCTCCTCC	CCCTCCTTCT	TCCCAAAGGC
	TGCCACCACC	TCCTCCTCCT	CCCCCTCCTC	CACTCCCAGA
	GAAAAAGCTC	ATTACCAGAA	ACATTGCAGA	AGTCATCAAA
10	CAACAGGAGA	GTGCCCAACG	GGCATTACAA	AATGGACAAA
	AAAAGAAAAA	AGGGAAAAAAG	GTCAAGAAAC	AGCCAAACAG
	TATTCTAAAG	GAAATAAAAA	ATTCTCTGAG	GTCAGTGCAA
	GAGAAGAAAA	TGGAAGACAG	TTCCCGACCT	TCTACCCAC
	AGAGATCAGC	TCATGAGAAT	CTCATGGAAG	CAATTCGGGG
15	AAGCAGCATA	AAACAGCTAA	AGCGGGTGGA	AGTTCCAGAA
	GCCCTGCGAT	GGGAACATGA	TCTTTAGAAG	AGGATGCAGA
	ACTGTTCAGT	GGTATTACAT	GAAATGCATT	GTGAGATGTT
	TCTAAAATAC	CTTCTTCAAT	TCAAAATGAT	CCCTGACTTT
	AAAAATAATC	TCACCCATTA	ATTCCAAAGA	GAATCTTAAG
20	AAACAATCAG	CATGTTTCTT	CTGTAAATAT	GAAAATAAAT
	TTCTTTTTTA	TGTCGTGAGA	TTTGTATTGG	CAAGAAGCAG
	TTAATTTAAA	GATGCTCTTC	CTATCTGTGG	ATGTGTTGGT
	AACTCCGAGT	TGTAATGAGT	TCATGAAATG	TGCTGTTATT
	TTTGTAATCT	CAATAAATGT	GGATTGAAGT	TTTTTCCCTT
25	TTTTTAAAGC	CAAACATAATA	TTTTTCTGTG	ACTTGATACA
	TCTGTCAGAT	TTTTGTAATC	TCGATAAATG	TGTATTGAAG
	TTTTTTCCCT	TTTTTTAAAA	AGCCAAACTA	ATATTTTTCT
	GTGAGTTAAT	ACATCTGTCAG	GTGTGTATGT	AACATTACTG
	GACATTAAAA	AAAATTATTAC	ATTCTC-poly(A)-Schwanz	

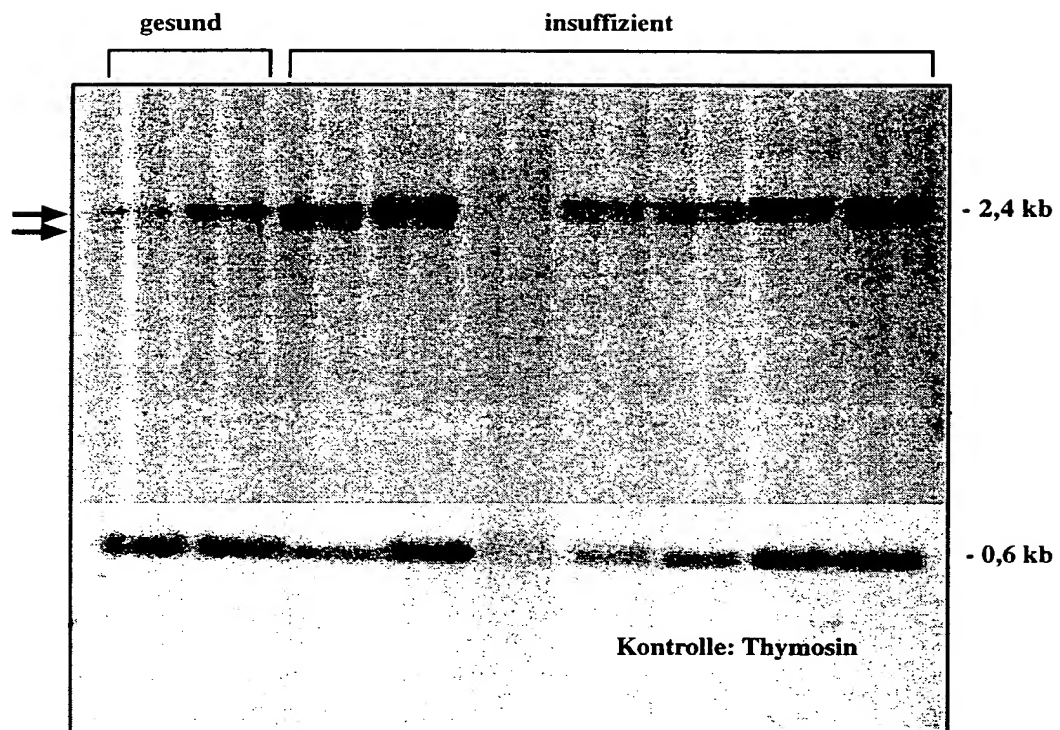
Fig. 4

5	MSTFGYRRGL	SKYESIDED	LLASLSAEEL	KELERELEDI
	EPDRNLPVGL	RQKSLTEKTP	TGTFSSREALM	AYWEKESQKL
	LEKERLGECG	KVAEDKEESE	EELIFTESNS	EVSEEVYTEE
	EEEEESQEEEE	EEDSDEEERT	IETAKGINGT	VNYDSVNSDN
	SKPKIFKSQI	ENINLTNGSN	GRNTESPAAI	HPCGNPTVIE
10	DALDKIKSND	PDTTEVNLNN	IENITTQTLT	RFAEALKDNT
	VVKTFSLANT	HADDSAAMAI	AEMLKANEHI	TNVNVESNFI
	TGKGILAIMR	ALQHNTVLTE	LRFHNQRHIM	GSQVEMEIVK
	LLKENTTLLR	LGYHFELPGP	RMSMTSILTR	NMDKQRQKRL
	QEQKQQEGYD	GGPNLRTKVV	QRGTPSSSPY	VSPRHSPWSS
15	<u>PKLPKKVQTV</u>	RSRPLSPVAT	LPPPPPPPPP	PPPSSQRLPP
	PPPPPPPPPLP	<u>EKKLITRNIA</u>	EVIKQQESAQ	RALQNGQKKK
	KGKKVKKQPN	SILKEIKNSL	RSVQEKKMED	SSRPSTPQRS
	AHENLMEAIR	GSSIKQLKRV	EVPEALRWEH	DL.

**Fig. 5a**



**Fig. 5b**



### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine Herz- und Skelettmuskel-spezifische Nukleinsäure, ihre Herstellung und Verwendung als Diagnostikum, s Arzneimittel und Test zur Identifizierung funktioneller Interaktoren.

# SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

### (i) ANMELDER:

- (A) NAME: MediGene Aktiengesellschaft
- (B) STRASSE: Lochhamer Str. 11
- (C) ORT: 82152 Martinsried
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-82152
- (G) TELEFON: 089-89 56 32 0
- (H) TELEFAX: 089-89 56 32 20

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Herzspezifische Nukleinsaeure, ihre Herstellung und Verwendung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 5

### (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

### (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1936 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(F) GEWEBETYP: Herzgewebe

### (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CAGCCTGCCA CTTGCCTCCC TGCCTGCTTC TGGCTGCCTT GAATGCCTGG TCCTTCAAGC	60
TCCTTCTGGG TCTGACAAAG CAGGGACCAT GTCTACCTTT GGCTACCGAA GAGGACTCAG	120
TAAATACGAA TCCATCGACG AGGATGAACT CCTCGCCTCC CTGTCAGCCG AGGAGCTGAA	180
GGAGCTAGAG AGAGAGTTGG AAGACATTGA ACCTGACCGC AACCTTCCCG TGGGGCTAAG	240
GCAAAAGAGC CTGACAGAGA AAACCCCCAC AGGGACATTC AGCAGAGAGG CACTGATGGC	300
CTATTGGGAA AAGGAGTCCC AAAA ACTCTT GGAGAAGGAG AGGCTGGGGG AATGTGGAAA	360
GGTTGCAGAA GACAAAGAGG AAAGTGAAGA AGAGCTTATC TTTACTGAAA GTAACAGTGA	420
GGTTTCTGAG GAAGTGATA CAGAGGAGGA GGAGGAGGAG TCCCAGGAGG AAGAGGAGGA	480
AGAAGACAGT GACGAAGAGG AAAGAACAAT TGAAACTGCA AAAGGGATTA ATGGAAGTGT	540
AAATTATGAT AGTGTCAATT CTGACAACTC TAAGCCAAAG ATATTTAAAA GTCAAATAGA	600



GAACATAAAT	TTGACCAATG	GCAGCAATGG	GAGGAACACA	GAGTCCCCAG	CTGCCATTCA	660
CCCTTGTGGA	AATCCTACAG	TGATTGAGGA	CGCTTTGGAC	AAGATTAAAA	GCAATGACCC	720
TGACACCACA	GAAGTCAATT	TGAACAACAT	TGAGAACATC	ACAACACAGA	CCCTTACCCG	780
CTTTGCTGAA	GCCCTCAAGG	ACAACACTGT	GGTGAAGACG	TTCAGTCTGG	CCAACACGCA	840
TGCCGACGAC	AGTGCAGCCA	TGGCCATTGC	AGAGATGCTC	AAAGCCAATG	AGCACATCAC	900
CAACGTAAAC	GTCGAGTCCA	ACTTCATAAC	GGGAAAGGGG	ATCCTGGCCA	TCATGAGAGC	960
TCTCCAGCAC	AACACGGTGC	TCACGGAGCT	GCGTTTCCAT	AACCAGAGGC	ACATCATGGG	1020
CAGCCAGGTG	GAAATGGAGA	TTGTCAAGCT	GCTGAAGGAG	AACACGACGC	TGCTGAGGCT	1080
GGGATACCAT	TTTGAACTCC	CAGGACCAAG	AATGAGCATG	ACGAGCATTT	TGACAAGAAA	1140
TATGGATAAA	CAGAGGCAAA	AACGTTTGCA	GGAGCAAAAA	CAGCAGGAGG	GATACGATGG	1200
AGGACCCAAT	CTTAGGACCA	AAGTCTGGCA	AAGAGGAACA	CCTAGCTCTT	CACCTTATGT	1260
ATCTCCCAGG	CACTCACCTT	GGTCATCCCC	AAAACCTCCC	AAAAAAGTCC	AGACTGTGAG	1320
GAGCCGTCCT	CTGTCTCCTG	TGGCCACACT	TCCTCCTCCT	CCCCCTCCTC	CTCCTCCTCC	1380
CCCTCCTTCT	TCCCAAAGGC	TGCCACCACC	TCCTCCTCCT	CCCCCTCCTC	CACTCCCAGA	1440
GAAAAAGCTC	ATTACCAGAA	ACATTGCAGA	AGTCATCAAA	CAACAGGAGA	GTGCCCCAACG	1500
GGCATTACAA	AATGGACAAA	AAAAGAAAAA	AGGGAAAAAG	GTCAAGAAAC	AGCCAAACAG	1560
TATTCTAAAG	GAAATAAAAA	ATTCTCTGAG	GTCAGTGCAA	GAGAAGAAAA	TGGAAGACAG	1620
TTCCCGACCT	TCTACCCAC	AGAGATCAGC	TCATGAGAAT	CTCATGGAAG	CAATTCGGGG	1680
AAGCAGCATA	AAACAGCTAA	AGCGGGTGGA	AGTTCCAGAA	GCCCTGCGAT	GGGAACATGA	1740
TCTTTAGAAG	AGGATGCAGA	ACTGTTTCACT	GGTATTACAT	GAAATGCATT	GTGAGATGTT	1800
TCTAAAATAC	CTTCTTCAAT	TCAAAATGAT	CCCTGACTTT	AAAAATAATC	TCACCCATTA	1860
ATTCCAAAGA	GAATCTTAAG	AAACAATCAG	CATGTTTCTT	CTGTAAATAT	GAAAAATAAAT	1920
TTCTTTTTTA	TGTCGT					1936

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2080 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(F) GEWEBETYP: Herzgewebe

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

CAGCCTGCCA	CTTGCCTCCC	TGCCTGCTTC	TGGCTGCCTT	GAATGCCTGG	TCCTTCAAGC	60
TCCTTCTGGG	TCTGACAAAG	CAGGGACCAT	GTCTACCTTT	GGCTACCGAA	GAGGACTCAG	120
TAAATACGAA	TCCATCGACG	AGGATGAACT	CCTCGCCTCC	CTGTCAGCCG	AGGAGCTGAA	180
GGAGCTAGAG	AGAGAGTTGG	AAGACATTGA	ACCTGACCGC	AACCTTCCCG	TGGGGCTAAG	240
GCAAAAGAGC	CTGACAGAGA	AAACCCCCAC	AGGGACATTC	AGCAGAGAGG	CACTGATGGC	300
CTATTGGGAA	AAGGAGTCCC	AAAAACTCTT	GGAGAAGGAG	AGGCTGGGGG	AATGTGGAAA	360
GGTTGCAGAA	GACAAAGAGG	AAAGTGAAGA	AGAGCTTATC	TTTACTGAAA	GTAACAGTGA	420
GGTTTCTGAG	GAAGTGTATA	CAGAGGAGGA	GGAGGAGGAG	TCCCAGGAGG	AAGAGGAGGA	480
AGAAGACAGT	GACGAAGAGG	AAAGAACAAT	TGAAACTGCA	AAAGGGATTA	ATGGAAGTGT	540
AAATTATGAT	AGTGTCAATT	CTGACAACTC	TAAGCCAAAG	ATATTTAAAA	GTCAAATAGA	600
GAACATAAAT	TTGACCAATG	GCAGCAATGG	GAGGAACACA	GAGTCCCCAG	CTGCCATTCA	660
CCCTTGTGGA	AATCCTACAG	TGATTGAGGA	CGCTTTGGAC	AAGATTAAAA	GCAATGACCC	720
TGACACCACA	GAAGTCAATT	TGAACAACAT	TGAGAACATC	ACAACACAGA	CCCTTACCCG	780
CTTTGCTGAA	GCCCTCAAGG	ACAACACTGT	GGTGAAGACG	TTCAGTCTGG	CCAACACGCA	840
TGCCGACGAC	AGTGCAGCCA	TGGCCATTGC	AGAGATGCTC	AAAGCCAATG	AGCACATCAC	900
CAACGTAAAC	GTCGAGTCCA	ACTTCATAAC	GGGAAAGGGG	ATCCTGGCCA	TCATGAGAGC	960
TCTCCAGCAC	AACACGGTGC	TCACGGAGCT	GCGTTTCCAT	AACCAGAGGC	ACATCATGGG	1020
CAGCCAGGTG	GAAATGGAGA	TTGTCAAGCT	GCTGAAGGAG	AACACGACGC	TGCTGAGGCT	1080
GGGATACCAT	TTTGAAGTCC	CAGGACCAAG	AATGAGCATG	ACGAGCATT	TGACAAGAAA	1140
TATGGATAAA	CAGAGGCAAA	AACGTTTGCA	GGAGCAAAAA	CAGCAGGAGG	GATACGATGG	1200
AGGACCCAAT	CTTAGGACCA	AAGTCTGGCA	AAGAGGAACA	CCTAGCTCTT	CACCTTATGT	1260
ATCTCCCAGG	CACTCACCCCT	GGTCATCCCC	AAAACCTCCC	AAAAAAGTCC	AGACTGTGAG	1320
GAGCCGTCCT	CTGTCTCCTG	TGGCCACACT	TCCTCCTCCT	CCCCCTCCTC	CTCCTCCTCC	1380
CCCTCCTTCT	TCCCAAAGGC	TGCCACCACC	TCCTCCTCCT	CCCCCTCCTC	CACTCCCAGA	1440

GAAAAAGCTC ATTACCAGAA ACATTGCAGA AGTCATCAAA CAACAGGAGA GTGCCCCAACG	1500
GGCATTACAA AATGGACAAA AAAAGAAAAA AGGGAAAAAG GTCAAGAAAC AGCCAAACAG	1560
TATTCTAAAG GAAATAAAAA ATTCTCTGAG GTCAGTGCAA GAGAAGAAAA TGGAAGACAG	1620
TTCCCGACCT TCTACCCAC AGAGATCAGC TCATGAGAAT CTCATGGAAG CAATTCGGGG	1680
AAGCAGCATA AAACAGCTAA AGCGGGTGGA AGTTCCAGAA GCCCTGCGAT GGAACATGA	1740
TCTTTAGAAG AGGATGCAGA ACTGTTTCACT GGTATTACAT GAAATGCATT GTGAGATGTT	1800
TCTAAAATAC CTTCTTCAAT TCAAATGAT CCCTGACTTT AAAAATAATC TCACCCATTA	1860
ATTCCAAAGA GAATCTTAAG AAACAATCAG CATGTTTCTT CTGTAAATAT GAAAATAAAT	1920
TTCTTTTTTA TGTCGTGAGA TTTGTATTGG CAAGAAGCAG TTAATTTAAA GATGCTCTTC	1980
CTATCTGTGG ATGTGTTGGT AACTCCGAGT TGTAATGAGT TCATGAAATG TGCTGTTATT	2040
TTTGTAATCT CAATAAATGT GGATTGAAGT TTTTTCCTT	2080

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 2268 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: JA
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
  - (F) GEWEBETYP: Herzgewebe

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

CAGCCTGCCA CTTGCCTCCC TGCCTGCTTC TGGCTGCCTT GAATGCCTGG TCCTTCAAGC	60
TCCTTCTGGG TCTGACAAAG CAGGGACCAT GTCTACCTTT GGCTACCGAA GAGGACTCAG	120
TAAATACGAA TCCATCGACG AGGATGAACT CCTCGCCTCC CTGTCAGCCG AGGAGCTGAA	180
GGAGCTAGAG AGAGAGTTGG AAGACATTGA ACCTGACCGC AACCTTCCCG TGGGGCTAAG	240
GCAAAAGAGC CTGACAGAGA AAACCCCCAC AGGGACATTC AGCAGAGAGG CACTGATGGC	300
CTATTGGGAA AAGGAGTCCC AAAAATCTT GGAGAAGGAG AGGCTGGGGG AATGTGGAAA	360
GGTTGCAGAA GACAAAGAGG AAAGTGAAGA AGAGCTTATC TTTACTGAAA GTAACAGTGA	420
GGTTTCTGAG GAAGTGTATA CAGAGGAGGA GGAGGAGGAG TCCCAGGAGG AAGAGGAGGA	480
AGAAGACAGT GACGAAGAGG AAAGAACAAT TGAAACTGCA AAAGGGATTA ATGGAACTGT	540
AAATTATGAT AGTGTCAATT CTGACAACTC TAAGCCAAAG ATATTTAAAA GTCAAATAGA	600
GAACATAAAT TTGACCAATG GCAGCAATGG GAGGAACACA GAGTCCCCAG CTGCCATTCA	660

CCCTTGTGGA AATCCTACAG TGATTGAGGA CGCTTTGGAC AAGATTAAAA GCAATGACCC	720
TGACACCACA GAAGTCAATT TGAACAACAT TGAGAACATC ACAACACAGA CCCTTACCCG	780
CTTTGCTGAA GCCCTCAAGG ACAACACTGT GGTGAAGACG TTCAGTCTGG CCAACACGCA	840
TGCCGACGAC AGTGCAGCCA TGGCCATTGC AGAGATGCTC AAAGCCAATG AGCACATCAC	900
CAACGTAAAC GTCGAGTCCA ACTTCATAAC GGGAAAGGGG ATCCTGGCCA TCATGAGAGC	960
TCTCCAGCAC AACACGGTGC TCACGGAGCT GCGTTTCCAT AACCAGAGGC ACATCATGGG	1020
CAGCCAGGTG GAAATGGAGA TTGTCAAGCT GCTGAAGGAG AACACGACGC TGCTGAGGCT	1080
GGGATACCAT TTTGAACTCC CAGGACCAAG AATGAGCATG ACGAGCATTT TGACAAGAAA	1140
TATGGATAAA CAGAGGCAAA AACGTTTGCA GGAGCAAAAA CAGCAGGAGG GATACGATGG	1200
AGGACCCAAT CTTAGGACCA AAGTCTGGCA AAGAGGAACA CCTAGCTCTT CACCTTATGT	1260
ATCTCCCAGG CACTCACCCCT GGTCATCCCC AAAACTCCCC AAAAAAGTCC AGACTGTGAG	1320
GAGCCGTCTT CTGTCTCCTG TGGCCACACT TCCTCCTCCT CCCCCCTCTC CTCCTCCTCC	1380
CCCTCCTTCT TCCCAAAGGC TGCCACCACC TCCTCCTCCT CCCCCCTCTC CACTCCCAGA	1440
GAAAAAGCTC ATTACCAGAA ACATTGCAGA AGTCATCAAA CAACAGGAGA GTGCCCAACG	1500
GGCATTACAA AATGGACAAA AAAAGAAAAA AGGGAAAAAG GTCAAGAAAC AGCCAAACAG	1560
TATTCTAAAG GAAATAAAAA ATTCTCTGAG GTCAGTGCAA GAGAAGAAAA TGGAAGACAG	1620
TTCCCGACCT TCTACCCAC AGAGATCAGC TCATGAGAAT CTCATGGAAG CAATTCGGGG	1680
AAGCAGCATA AAACAGCTAA AGCGGGTGGA AGTTCCAGAA GCCCTGCGAT GGGAACATGA	1740
TCTTTAGAAG AGGATGCAGA ACTGTTTCACT GGTATTACAT GAAATGCATT GTGAGATGTT	1800
TCTAAATAC CTTCTTCAAT TCAAAATGAT CCCTGACTTT AAAAATAATC TCACCCATTA	1860
ATTCCAAAGA GAATCTTAAG AAACAATCAG CATGTTTCTT CTGTAAATAT GAAAATAAAT	1920
TTCTTTTTTA TGTCGTGAGA TTTGTATTGG CAAGAAGCAG TTAATTAAAA GATGCTCTTC	1980
CTATCTGTGG ATGTGTTGGT AACTCCGAGT TGTAATGAGT TCATGAAATG TGCTGTTATT	2040
TTTGTAATCT CAATAAATGT GGATTGAAGT TTTTTCCTT TTTTAAAGC CAAACTAATA	2100
TTTTTCTGTG ACTTGATACA TCTGTCAGAT TTTTGTAATC TCGATAAATG TGTATTGAAG	2160
TTTTTTCCTT TTTTTTAAAA AGCCAAACTA ATATTTTCTT GTGAGTTAAT ACATCTGTCA	2220
GGTGTGTATG TAACATTACT GGACATTAAA AAAAATTATT ACATTCTC	2268

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 552 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: JA
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
  - (F) GEWEBETYP: Herzgewebe

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met	Ser	Thr	Phe	Gly	Tyr	Arg	Arg	Gly	Leu	Ser	Lys	Tyr	Glu	Ser	Ile	
1				5					10					15		
Asp	Glu	Asp	Glu	Leu	Leu	Ala	Ser	Leu	Ser	Ala	Glu	Glu	Leu	Lys	Glu	
			20					25					30			
Leu	Glu	Arg	Glu	Leu	Glu	Asp	Ile	Glu	Pro	Asp	Arg	Asn	Leu	Pro	Val	
		35					40					45				
Gly	Leu	Arg	Gln	Lys	Ser	Leu	Thr	Glu	Lys	Thr	Pro	Thr	Gly	Thr	Phe	
	50					55					60					
Ser	Arg	Glu	Ala	Leu	Met	Ala	Tyr	Trp	Glu	Lys	Glu	Ser	Gln	Lys	Leu	
65					70					75					80	
Leu	Glu	Lys	Glu	Arg	Leu	Gly	Glu	Cys	Gly	Lys	Val	Ala	Glu	Asp	Lys	
				85					90					95		
Glu	Glu	Ser	Glu	Glu	Glu	Leu	Ile	Phe	Thr	Glu	Ser	Asn	Ser	Glu	Val	
			100					105					110			
Ser	Glu	Glu	Val	Tyr	Thr	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Ser	Gln	Glu	Glu	
	115					120						125				
Glu	Glu	Glu	Glu	Asp	Ser	Asp	Glu	Glu	Glu	Arg	Thr	Ile	Glu	Thr	Ala	
	130					135					140					
Lys	Gly	Ile	Asn	Gly	Thr	Val	Asn	Tyr	Asp	Ser	Val	Asn	Ser	Asp	Asn	
145					150				155						160	
Ser	Lys	Pro	Lys	Ile	Phe	Lys	Ser	Gln	Ile	Glu	Asn	Ile	Asn	Leu	Thr	
				165					170					175		
Asn	Gly	Ser	Asn	Gly	Arg	Asn	Thr	Glu	Ser	Pro	Ala	Ala	Ile	His	Pro	
			180					185					190			
Cys	Gly	Asn	Pro	Thr	Val	Ile	Glu	Asp	Ala	Leu	Asp	Lys	Ile	Lys	Ser	
		195					200					205				
Asn	Asp	Pro	Asp	Thr	Thr	Glu	Val	Asn	Leu	Asn	Asn	Ile	Glu	Asn	Ile	
	210					215						220				
Thr	Thr	Gln	Thr	Leu	Thr	Arg	Phe	Ala	Glu	Ala	Leu	Lys	Asp	Asn	Thr	
225				230					235						240	
Val	Val	Lys	Thr	Phe	Ser	Leu	Ala	Asn	Thr	His	Ala	Asp	Asp	Ser	Ala	
				245					250					255		

Ala	Met	Ala	Ile 260	Ala	Glu	Met	Leu	Lys 265	Ala	Asn	Glu	His	Ile 270	Thr	Asn
Val	Asn	Val 275	Glu	Ser	Asn	Phe	Ile 280	Thr	Gly	Lys	Gly	Ile 285	Leu	Ala	Ile
Met	Arg 290	Ala	Leu	Gln	His	Asn 295	Thr	Val	Leu	Thr	Glu 300	Leu	Arg	Phe	His
Asn 305	Gln	Arg	His	Ile	Met 310	Gly	Ser	Gln	Val	Glu 315	Met	Glu	Ile	Val	Lys 320
Leu	Leu	Lys	Glu	Asn 325	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg 330	Leu	Gly	Tyr	His	Phe	Glu
Leu	Pro	Gly	Pro 340	Arg	Met	Ser	Met	Thr 345	Ser	Ile	Leu	Thr	Arg 350	Asn	Met
Asp	Lys	Gln 355	Arg	Gln	Lys	Arg	Leu 360	Gln	Glu	Gln	Lys	Gln 365	Gln	Glu	Gly
Tyr	Asp 370	Gly	Gly	Pro	Asn	Leu 375	Arg	Thr	Lys	Val	Trp 380	Gln	Arg	Gly	Thr
Pro 385	Ser	Ser	Ser	Pro	Tyr 390	Val	Ser	Pro	Arg	His 395	Ser	Pro	Trp	Ser	Ser 400
Pro	Lys	Leu	Pro	Lys 405	Lys	Val	Gln	Thr	Val 410	Arg	Ser	Arg	Pro	Leu 415	Ser
Pro	Val	Ala	Thr 420	Leu	Pro	Pro	Pro	Pro 425	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro 430	Pro	Pro
Pro	Ser	Ser 435	Gln	Arg	Leu	Pro	Pro 440	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro 445	Pro	Pro	Pro
Leu	Pro 450	Glu	Lys	Lys	Leu	Ile 455	Thr	Arg	Asn	Ile	Ala 460	Glu	Val	Ile	Lys
Gln 465	Gln	Glu	Ser	Ala	Gln 470	Arg	Ala	Leu	Gln	Asn 475	Gly	Gln	Lys	Lys	Lys 480
Lys	Gly	Lys	Lys	Val 485	Lys	Lys	Gln	Pro	Asn 490	Ser	Ile	Leu	Lys	Glu 495	Ile
Lys	Asn	Ser	Leu 500	Arg	Ser	Val	Gln	Glu 505	Lys	Lys	Met	Glu	Asp 510	Ser	Ser
Arg	Pro	Ser 515	Thr	Pro	Gln	Arg	Ser 520	Ala	His	Glu	Asn	Leu 525	Met	Glu	Ala
Ile	Arg 530	Gly	Ser	Ser	Ile	Lys 535	Gln	Leu	Lys	Arg	Val 540	Glu	Val	Pro	Glu
Ala 545	Leu	Arg	Trp	Glu	His 550	Asp	Leu								

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 10 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: JA
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
  - (F) GEWEBETYP: Herzgewebe
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

CCTTCTACCC

